

正交试验优选四叶参中四叶参皂苷的提取工艺

张 朦*, 史彩云, 宋学硕, 黄亦琼, 李萌萌, 武 佳[#](首都医科大学燕京医学院, 北京 101300)

中图分类号 R284.2;R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)03-0240-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.03.16

摘要 目的: 优选四叶参中四叶参皂苷的提取工艺。方法: 采用单因素试验考察提取溶剂、提取时间、溶剂用量对四叶参皂苷溶出的影响; 以溶剂用量、提取次数、提取时间为考察因素, 以四叶参皂苷提取率为评价指标, 采用正交试验优选提取工艺。结果: 最佳提取工艺为加30倍量的甲醇, 超声提取3次, 每次40 min。结论: 所选工艺合理、可行, 可用于四叶参中四叶参皂苷的提取。

关键词 四叶参; 四叶参皂苷; 提取工艺

Optimization of the Extraction Technology of Codonoposide in *Codonopsis lanceolata* by Orthogonal Test

ZHANG Meng, SHI Cai-yun, SONG Xue-shuo, HUANG Yi-qiong, LI Meng-meng, WU Jia (Yanjing Medical College, Capital Medical University, Beijing 101300, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of codonoposide in *Codonopsis lanceolata*. METHODS: The effects of extraction solvent, extraction time and the amount of solvent on the dissolution of *C. lanceolata* were investigated by single factor test; the extraction technology of *C. lanceolata* was optimized by orthogonal test with the amount of solvent, extraction times and extraction time as factors using the yield of codonoposide as index. RESULTS: The optimum extraction process was methanol reflux extraction as follows: 30 folds ethanol, extracting for 3 times, 40 min each time. CONCLUSIONS: The technology is reasonable and feasible, which is suitable for the extraction of codonoposide in *C. lanceolata*.

KEYWORDS *Codonopsis lanceolata*; Codonoposide; Extraction technology

表2 正交试验结果

Tab 2 Results of orthogonal test

试验号	A, min	B, %	C, g/ml	D, 次	总黄酮含量, mg/g
1	1	1	1	1	7.2
2	1	2	2	2	4.4
3	1	3	3	3	6.8
4	2	1	2	3	6.2
5	2	2	3	1	5.5
6	2	3	1	2	4.2
7	3	1	3	2	10.6
8	3	2	1	3	5.4
9	3	3	2	1	6.5
K_1	6.133	8.000	5.600	6.400	
K_2	5.300	5.100	5.700	6.400	
K_3	7.500	5.833	7.633	6.133	
R	2.200	2.900	2.033	0.267	

表3 方差分析结果

Tab 3 Analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	均方	F	P
A	7.402	2	3.701	52.127	<0.05
B	13.642	2	6.821	96.070	<0.05
C	7.882	2	3.941	55.507	<0.05
D(误差)	0.142	2	0.071	1.000	

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$

note: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$

酮10.83 mg, 与正交试验最高值相当, 表明所选工艺稳定、可行, 重现性好, 可用于枸骨果实中总黄酮的提取。

* 药士。研究方向: 药房管理。E-mail: pharmzhangmeng@126.com

[#] 通信作者: 讲师, 硕士。研究方向: 天然药物的教学及科研。电话: 010-69426761。E-mail: wujia026@126.com

3 讨论

笔者曾分别考察超声提取法、回流提取法、索氏提取法对枸骨果实中总黄酮提取率的影响, 结果超声提取法的提取率较高, 故选用此法。笔者也曾分别考察水、甲醇、乙醇对提取率的影响, 结果乙醇为溶剂时的提取率高于水和甲醇, 故选用乙醇为提取溶剂。

笔者通过预试验发现, 药材浸泡时间、粉碎粒度和超声功率对提取率影响较小, 故以对提取率影响较大的提取时间、乙醇体积分数、料液比、提取次数为考察因素。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 233.
- [2] 祝晨陈, 杨金燕, 林朝展. 冬青属植物化学成分及药理活性的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(2): 759.
- [3] 李维林, 吴菊兰, 任冰如, 等. 枸骨的化学成分[J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(2): 1.
- [4] 陈强. 苦丁茶中槲皮素成分分析[J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(2): 1.
- [5] 张凤礼, 曾超珍, 刘志祥. 枸骨叶总皂苷提取工艺的研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2010, 30(9): 194.
- [6] 张洁, 喻蓉, 吴霞, 等. 枸骨叶的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(5): 821.
- [7] Zhou SX, Yao ZR, Li J, et al. Flavonoids from the leaves of *Ilex cornuta*[J]. *Chin J Nat Med*, 2012, 10(2): 84.
- [8] 范志英. RP-HPLC测定无刺枸骨不同部位中齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 浙江中医杂志, 2010, 45(2): 144.
- [9] 陈丛瑾, 王琪, 李欣. 黄酮类化合物抗氧化和抑菌生物活性研究进展[J]. 中国药房, 2011, 22(35): 3 346.

(收稿日期: 2013-03-01 修回日期: 2013-06-02)

四叶参(*Codonopsis lanceolata* Benth.et Hook.F.)为桔梗科党参属四叶参的干燥根,又名羊奶、羊乳、轮叶党参、山海螺等^[1]。其性平,味甘、苦,有养阴润肺、补气通乳、消肿排脓、清热解毒之功效。现代药理研究表明,四叶参有提高免疫力、镇静、镇痛、抗惊厥、镇咳、抗肿瘤等生理活性^[2]。徐勤等^[3]、刘利娥等^[4]分别采用自动氨基酸分析仪和高效液相色谱(HPLC)法,对四叶参中的氨基酸成分进行分析研究;周茂金等^[5]采用苯酚-硫酸比色法,测定了不同生长年限的泰山四叶参中多糖的含量,可为确定泰山四叶参的合理采收时间提供参考。笔者对四叶参皂苷(Codonoposide)的提取工艺进行优化,旨在为四叶参皂苷对照品的制备及四叶参的质量控制研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

20A HPLC仪(包括SPD-M20A检测器、DGU-20A3在线脱气系统、CTO-10AS VP柱温箱)、220D电子分析天平(万分之一级)均购于日本岛津公司;SK2200LHC超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司,功率:100 W,频率:53 kHz);RE-5299旋转蒸发器(上海振捷实验设备公司);SHB-IV双A循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);HWS24电热恒温水浴锅(上海一恒科技有限公司)。

1.2 药材

四叶参药材购自河北省安国市瑞琪中药材有限公司,经北京协和医学院药用植物研究所张本刚研究员鉴定为四叶参*C. lanceolata* Benth.et Hook.F.的干燥根。

1.3 试剂

四叶参皂苷由首都医科大学燕京医学院药学综合实验室自制,经核磁共振、质谱鉴别,化合物确为四叶参皂苷,经HPLC测定,纯度>95%^[6];乙腈(色谱纯,美国Burdick&Jackson公司);水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 四叶参皂苷含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸水(30:70, V/V);流速:1.0 ml/min;柱温:30 ℃;检测波长:203 nm;进样量:10 μl。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取四叶参皂苷对照品适量,加甲醇溶解并制备成质量浓度为3.482 mg/ml的对照品贮备液,于4 ℃避光密闭保存。精密吸取此贮备液适量,采用等比稀释法,制备成质量浓度为3.482 0~0.217 6 mg/ml的系列浓度对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取四叶参粉末1 g,精密称定,置具塞三角瓶中,加入甲醇10 ml,浸渍过夜,称定质量,超声提取30 min,放冷,补足失质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取质量浓度为3.482、1.741、0.870 5、0.435 3、0.217 6 mg/ml的对照品溶液各5 μl,按上述色谱条件重复进样2次,测定峰面积积分值。以进样量(x, μg)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,采用最小二乘法计算回归方程,得回归方程为 $y=1.69 \times 10^5 x + 1.98 \times 10^4$ ($r=0.999 9$, $P < 0.05$)。结果表明,四叶参皂苷进样量在1.09~17.41 μg范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.1.5 精密度试验 精密吸取四叶参皂苷对照品溶液(质量浓度:1.741 mg/ml)适量,按上述色谱条件重复进样6次,每次

5 μl,测定峰面积积分值。结果,峰面积积分值分别为1 476 418、1 485 112、1 480 933、1 478 520、1 471 989、1 469 998, RSD=0.38% ($n=6$),表明仪器精密密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取供试品溶液适量,按上述色谱条件在4、8、12、16、20、24 h分别测定,每次进样10 μl。结果,峰面积积分值分别为599 069、600 147、598 739、599 831、598 047、605 035, RSD=0.42% ($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.1.7 加样回收率试验 精密称取四叶参粉末0.5 g,置具塞三角瓶中,精密加入四叶参皂苷对照品1.741 mg,按“2.1.3”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按上述色谱条件测定四叶参皂苷含量,并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=6$)

称样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
0.508 7	1.750	1.741	3.511	101.1		
0.500 6	1.722	1.741	3.535	104.1		
0.498 7	1.716	1.741	3.500	102.5	98.3	1.73
0.499 3	1.718	1.741	3.440	98.9		
0.501 2	1.724	1.741	3.627	109.3		
0.504 4	1.735	1.741	3.553	104.4		

2.2 单因素试验

2.2.1 提取溶剂的考察 称取四叶参粉末1 g,精密称定,共6份,分别加入50%乙醇、70%乙醇、95%乙醇、50%甲醇、70%甲醇、100%甲醇(以下简称甲醇)各10 ml,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样分析,测定四叶参皂苷含量,并按下式计算四叶参皂苷提取率:提取率=(峰面积积分值-19 753)/168 641×1 000×样品质量×100%。结果显示,采用甲醇为提取溶剂时,四叶参皂苷的提取率最高,而以50%乙醇为提取溶剂时,几乎不能提取到四叶参皂苷,故选择甲醇为提取溶剂。提取溶剂的考察结果见表2。

表2 提取溶剂、提取时间、溶剂用量的考察结果

Tab 2 The investigation results of extraction solvent, extraction time and the amount of solvent

因素	水平	样品质量,g	四叶参皂苷提取率,%
提取溶剂	50%乙醇	1.011 7	
	70%乙醇	1.001 9	0.21
	95%乙醇	1.001 5	0.13
	50%甲醇	0.999 2	0.11
	70%甲醇	1.003 9	0.29
	甲醇	1.002 8	0.34
提取时间,min	20	1.005 1	0.11
	30	1.003 4	0.14
	40	1.002 9	0.19
	50	1.004 7	0.30
	60	0.999 8	0.43
	溶剂用量,倍	10	0.999 3
20		1.002 8	0.20
30		1.001 4	0.33
40		1.004 3	0.33

2.2.2 提取时间的考察 称取四叶参粉末1 g,精密称定,共5份,加入甲醇10 ml,分别超声提取20、30、40、50、60 min,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样分析,测定四叶参皂苷含量,并计算四叶参皂苷提取率。结果显示,随着提取时间的延长,四叶参皂苷的提取率增高。由于提取20 min时提取率太低,而提取60 min时,虽然提取率

较高,但提取时间成本偏高,故将提取时间确定在30~50 min范围内。提取时间的考察结果见表2。

2.2.3 溶剂用量的考察 称取四叶参粉末1 g,精密称定,共4份,分别加入10、20、30、40倍量的甲醇,超声提取30 min,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样分析,测定四叶参皂苷含量,并计算四叶参皂苷提取率。结果显示,随着溶剂用量的增加,提取率逐渐增高,但加入30倍量溶剂后,提取率增加不明显,故选择溶剂用量为30倍量。溶剂用量的考察结果见表2。

2.3 正交试验优选提取工艺

根据单因素试验结果,在兼顾提取效率和降低成本的前提下,选择溶剂用量(A)、提取次数(B)、提取时间(C)为考察因素,以四叶参皂苷提取率为评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验。因素与水平见表3;正交试验结果见表4;方差分析结果见表5。

表3 因素与水平

Tab 3 Factors and levels

水平	因素		
	A,倍	B,次	C,min
1	10	1	30
2	20	2	40
3	30	3	50

表4 正交试验结果

Tab 4 Results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D(误差)	样品质量,g	四叶参皂苷提取率,%
1	1	1	1	1	0.999 5	0.14
2	1	2	2	2	1.007 8	0.30
3	1	3	3	3	1.003 3	0.42
4	2	1	2	3	0.999 9	0.22
5	2	2	3	1	1.000 9	0.35
6	2	3	1	2	1.000 5	0.46
7	3	1	3	2	1.000 1	0.35
8	3	2	1	3	1.000 6	0.38
9	3	3	2	1	1.000 3	0.49
I	0.86	0.71	0.98	0.98		
II	1.03	1.03	1.01	1.11		
III	1.22	1.37	1.12	1.02		
R	2.16×10^{-2}	7.26×10^{-2}	3.62×10^{-3}	0.30		

表5 方差分析结果

Tab 5 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
A	2.16×10^{-2}	2	1.08×10^{-2}	2.43×10^{13}	<0.01
B	7.26×10^{-2}	2	3.63×10^{-2}	8.18×10^{13}	<0.01
C	0.36×10^{-2}	2	0.18×10^{-2}	0.41×10^{13}	<0.01
D(误差)	0.30×10^{-2}	2	0.15×10^{-2}	0.33×10^{13}	<0.01

注: $F_{0.01}(2,2)=99.00$

ntoe: $F_{0.01}(2,2)=99.00$

由表4、表5可知,各因素影响提取工艺的主次顺序是B>A>C,各因素对提取工艺的影响均有统计学意义($P<0.01$)。最佳提取工艺为 $A_3B_3C_3$,即加30倍量的溶剂,超声提取3次,每次50 min。但是,考虑到C因素对提取工艺影响最小,且要体现超声提取法速度快的优点,故选择第2水平,即提取时间为每次40 min。

2.4 工艺验证试验

为验证工艺的合理性,称取4批不同商品来源的四叶参药

材适量,按上述优选的工艺进行提取,并测定四叶参皂苷提取率。结果,四叶参皂苷提取率与正交试验结果最高值相当,表明所选工艺合理、可行,可用于四叶参中四叶参皂苷的提取。工艺验证试验结果见表6。

表6 工艺验证试验结果

Tab 6 Results of validation tests

药材编号	样品质量,g	峰面积分值	四叶参皂苷提取率,%
1	0.998 5	861 695	0.50
2	1.008 2	767 856	0.44
3	1.004 7	883 869	0.51
4	1.001 3	830 281	0.48

3 讨论

据文献报道,四叶参皂苷具有显著的抗炎活性^[7],而且在四叶参中含量最为丰富、稳定性好^[6-9],故选择其作为工艺筛选的指标。

由于四叶参皂苷为三萜皂苷类化合物,具有末端吸收,因此选择乙腈为有机相;因其分子结构中具羧基,加入少量酸可纠正其拖尾现象,笔者比较了磷酸和冰醋酸为流动相的结果,最终确定以乙腈-0.1%磷酸水为流动相。笔者将四叶参皂苷在190~400 nm波长范围内进行全波长扫描,其在203 nm波长处有最强吸收峰,故将检测波长设为203 nm。

参考文献

- [1] 陈汉斌,郑亦津,李法曾.山东植物志:下卷[M].青岛:青岛出版社,1997:1-1 531.
- [2] 付成国,文连奎,董然.轮叶党参化学成分与药理作用研究进展[J].中药材,2007,30(4):497.
- [3] 徐勤,刘布鸣,邓立东,等.中药四叶参中的氨基酸分析[J].广西科学,2008,15(2):176.
- [4] 刘利娥,常爱武,韩萍,等.反相高效液相色谱法测定野生四叶参中氨基酸[J].郑州大学学报:医学版,2008,43(1):101.
- [5] 周茂金,王莉,苏美英,等.不同生长年限泰山四叶参中多糖的含量测定[J].中国药房,2010,21(35):3 327.
- [6] Lee KT, Choi J, Jung WT, et al. Structure of a new echinocystic acid bisdesmoside isolated from *Codonopsis lanceolata* roots and the cytotoxic activity of prosapogenins [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(15): 4 190.
- [7] Xu LP, Wang H, Yuan Z. Triterpenoid saponins with anti-inflammatory activity from *Codonopsis lanceolata* [J]. *Planta Med*, 2008, 74(11): 1 412.
- [8] Ushijima M, Komoto N, Sugizono Y, et al. Triterpene glycosides from the roots of *Codonopsis lanceolata* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2008, 56(3): 308.
- [9] Lee KW, Jung HJ, Park HJ, et al. Beta-D-xylopyranosyl-(1→3)-beta-D-glucuronopyranosyl echinocystic acid isolated from the roots of *Codonopsis lanceolata* induces caspase-dependent apoptosis in human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(5): 854.

(收稿日期:2013-03-21 修回日期:2013-07-21)